

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

DB

地 方 标 准

DB XX/T XXXX—XXXX

化妆品用原料 重组人源化胶原蛋白的鉴定

Identification process of recombinant humanized collagen

(工作组讨论稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

发 布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

化妆品用原料 重组人源化胶原蛋白的鉴定

1 范围

本标准规定了化妆品用原料重组人源化胶原蛋白鉴定术语定义和鉴定操作规程。
本标准适用于化妆品用原料重组人源化胶原蛋白的鉴定操作。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

YY/T 1888 重组人源化胶原蛋白

3 中华人民共和国药典术语和定义

YY/T 1888 界定的术语和定义适用于本文件。

4 项目

4.1 肽段覆盖率（氨基酸序列覆盖度）

肽段覆盖率是指检测到肽段的氨基酸数量占该蛋白质总氨基酸数量的比例。蛋白质经过酶切后，采用LC-MS进行检测，鉴定到的酶切后肽段占理论序列氨基酸数量的比例。采用质谱法能快速、准确、高效检测蛋白肽段覆盖率。

4.2 末端氨基酸序列

胶原蛋白的末端标志着 DNA 转录翻译成蛋白质过程的初步完成，参与和调控了蛋白质的各种生理功能。研究末端氨基酸序列不仅有利于完整蛋白质的鉴定，对于在分子水平理解蛋白质的信号传导和生化功能也是十分必要的。使用蛋白酶对供试品进行酶解处理后，采用 LC-MS/MS 对酶解后样品进行检测，通过软件对 LC-MS/MS 原始文件进行分析，获得重组人源化胶原蛋白末端序列检测结果。

4.3 氨基酸序列确认

根据YY/T 1888 5.3.1的描述要求，企业提供的理论氨基酸序列及检测结果，将氨基酸序列与人胶原蛋白数据库进行比对，如NCBI数据库（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）。根据数据库匹配结果确认其是否为重组人源化胶原蛋白。

5 设备和材料

5.1 设备和材料

超纯水仪；分析天平（十万级）；离心机；水浴锅或恒温箱；涡旋仪；高效液相色谱仪；高效液相色谱串联质谱仪；色谱柱；PTFE 滤膜；PVDF 膜；Prosorb。

5.2 试剂

- a) 50 mM 碳酸氢铵：0.1580g 碳酸氢铵溶解到 40mL 水中；
- b) 7M 盐酸胍：16.7176g 盐酸胍中加入 50mM 碳酸氢铵 25mL；
- c) 1M DL-二硫苏糖醇（DTT）：精密称取 0.1542 g DTT 加 7M 盐酸胍 1.0 mL 溶解，即得；
- d) 1M 碘乙酰胺（IAM）：0.9248g 碘乙酰胺溶解到 5mL 7M 盐酸胍；
- e) Lys-C；
- f) 甲酸、乙腈，使用质谱纯。

6 操作规程

6.1 肽段覆盖率

6.1.1 样品处理

- 1) 取 250 ug 蛋白溶液置于超滤管中，用 50 mM 碳酸氢铵溶液补足体积 150 ul。14000g 离心至见底。
- 2) 加入 100ul 7M 盐酸胍（盐酸胍使用 50mM 碳酸氢铵配），再加入 4ul 1M DTT（DTT 溶于 7M 盐酸胍），涡旋震荡使蛋白均匀分布于溶液中，震荡后短时低速离心，使溶液处于管的底部，之后 55 度孵育 1 小时。
- 3) 加入 10ul 1M 的碘乙酰胺，震荡混匀后低速离心，使溶液处于管底，避光室温放置 30min。碘乙酰胺也用 7M 盐酸胍配。14000g 离心至见底。
- 4) 加入 100ul 50mM 碳酸氢铵，14000g 离心至见底。重复两次。
- 5) 将超滤管取出置于新的接收管中，加入 100ul 50mM 碳酸氢铵，加入 0.2ug/ul 的胰蛋白酶 25ul。之后旋涡震荡，使蛋白溶液均匀分布，之后短时低速离心至超滤管底部，封口膜封好放置于 37°C 恒温箱中过夜。

6.1.2 仪器条件

- 1) 色谱柱：反相 C18，1.6um
- 2) 流动相：A 相，0.1%FA 水溶液；B 相，0.1%FA 乙腈溶液；
- 3) 流速：0.2 mL/min；
- 4) 柱温：40°C；
- 5) 进样体积：4 ul；
- 6) 离子源：ESI
- 7) 检测方式：正离子；
- 8) MS 扫描范围 200-2000 m/z；
- 9) MS/MS 扫描范围 50-2500 m/z。

表1 色谱分离梯度

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
1	98	2

时间 (min)	A (%)	B (%)
43	70	30
50	50	50
55	20	80
55.5	98	2
60	98	2

6.1.3 数据分析

产生的原始数据及图谱由数据分析软件识别标峰并导出对应图谱，通过质谱数据和相关质谱鉴定图谱进行数据库匹配，得出肽段覆盖率鉴定结果。

重组人源化胶原蛋白液质检测总离子流图谱见附录A示图A.1，数据库匹配结果见附录A示图A.2。

6.2 末端氨基酸序列操作步骤

6.2.1 样品处理

同上6.1.1。

6.2.1.1 仪器条件

同上6.1.2

6.2.2 C 端序列检查结果和分析

产生的原始数据及图谱由数据分析软件识别标峰并导出对应图谱，通过质谱数据和相关质谱鉴定图谱进行数据库匹配，得出供试品的 C 末端序列鉴定结果。

重组人源化胶原蛋白液质检测C末端b,y离子图谱见附录A示图A.3，数据库匹配结果见附录A示图A.4。

6.2.3 N 端序列检查结果和分析

产生的原始数据及图谱由数据分析软件识别标峰并导出对应图谱，通过质谱数据和相关质谱鉴定图谱进行数据库匹配，得出供试品的 N 末端序列鉴定结果。

重组人源化胶原蛋白液质检测N末端b,y离子图谱见附录A示图A.5，数据库匹配结果见附录A示图A.6。

6.3 氨基酸序列确认操作步骤

6.3.1 与数据库匹配

理论氨基酸序列与数据库比对。

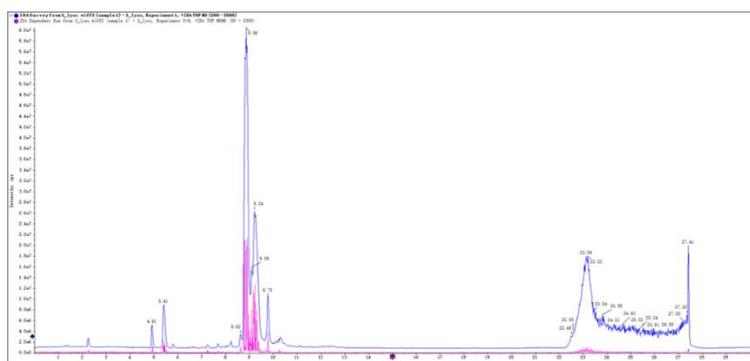
(以 NCBI 数据库 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 为例,先输入网址,点击“Protein BLAST”,进入 blastp suite 界面,在 Enter Query Sequence 下框中输入理论氨基酸序列,点击 BLAST,进入界面,点击 Homo sapiens 对应型别的人胶原蛋白。)

6.3.2 结果判定

理论氨基酸序列与人胶原蛋白某亚型序列匹配度为100%同,为A型重组人源化胶原蛋白;理论氨基酸序列与人胶原蛋白某亚型序列匹配度大于90%,小于100%,为B型重组人源化胶原蛋白。

附 录 A
(资料性)
重组人源化胶原蛋白鉴定结果

A.1 重组人源化胶原蛋白肽段覆盖率鉴定结果见图 A.1 和 A.2。



图A.1 重组人源化胶原蛋白 Lys-C 产物 TIC 图谱

Coverage	
Collagen	
Overall	Total Mass Only Mass and MS/MS
	100.0% 0.0% 100.0%
.....1020
GERGAPGFRG	PAGPNGIPGE
.....3040
KGPAGERGAP	GERGAPGFRG
.....5060
PAGPNGIPGE	KGPAGERGAP
.....7080
GERGAPGFRG	PAGPNGIPGE
.....90100
KGPAGERGAP	GERGAPGFRG
.....110120
PAGPNGIPGE	KGPAGERGAP
.....130140
GERGAPGFRG	PAGPNGIPGE
.....150160
KGPAGERGAP	GERGAPGFRG
.....170180
PAGPNGIPGE	KGPAGERGAP
.....190200
GERGAPGFRG	PAGPNGIPGE
.....210220
KGPAGERGAP	GERGAPGFRG
.....230240
PAGPNGIPGE	KGPAGERGAP
.....250260
GERGAPGFRG	PAGPNGIPGE
.....270280
KGPAGERGAP	GERGAPGFRG
.....290300
PAGPNGIPGE	KGPAGERGAP
.....310320
GERGAPGFRG	PAGPNGIPGE
.....330340
KGPAGERGAP	GERGAPGFRG
.....350360
PAGPNGIPGE	KGPAGERGAP
.....370380
GERGAPGFRG	PAGPNGIPGE
.....390400
KGPAGERGAP	GERGAPGFRG
.....410420
PAGPNGIPGE	KGPAGERGAP
.....430440
GERGAPGFRG	PAGPNGIPGE
.....450460
KGPAGERGAP	GERGAPGFRG
.....470480
PAGPNGIPGE	KGPAGERGAP

图A.2 重组人源化胶原蛋白 Lys-C 酶解肽段覆盖率

A.2 重组人源化胶原蛋白 C 端鉴定结果见图 A.3 和 A.4。

